

Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos do bagaço de uva

Autor: Laura Maia de Souza

Orientadora: Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadoras: Júlia Ribeiro Sarkis

Giovana Domeneghini Mercali

Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	2
2.1	A uva	2
2.1.1	Análise de mercado	2
2.1.2	Composição físico-química	2
2.1.3	O bagaço de uva	5
2.1.4	Compostos fenólicos	5
2.2	Extração convencional	7
2.3	Extração assistida por ultrassom	8
3	Materiais e Métodos	10
3.1	Bagaço de uva	10
3.2	Análise da intensidade do ultrassom	10
3.3	Análise do tempo de pré-tratamento e da altura de imersão da sonda	11
3.3.1	Análise do tempo de pré-tratamento	11
3.3.2	Análise da altura de imersão da sonda	12
3.3.3	Etapa de difusão	12
3.4	Planejamento experimental	14
3.5	Experimento para comparação de tecnologias	17
3.5.1	Controle	17
3.5.2	Moagem	17
3.6	Análises laboratoriais	17
3.7	Análises estatísticas	18
4	Resultados	19
4.1	Curva analítica dos compostos fenólicos	19
4.2	Análise da intensidade de potência do ultrassom	19
4.3	Análise do tempo de pré-tratamento	20
4.4	Análise da altura de imersão da sonda	21
4.5	Planejamento experimental	23
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	27
6	Referências	29

Agradecimentos

A Deus, por ter me capacitado dia após dia para o cumprimento das minhas tarefas e nunca ter me desamparado.

Aos meus pais, Flávio e Mirian, pela dedicação e amor, e por sempre acreditarem e incentivarem meus sonhos.

Aos meus irmãos, Matheus, Luiza e Gustavo, por estarem sempre prontos a ajudar e serem companhia constante.

Ao meu esposo, Jonathan, e meus filhos, Vítor e Eduarda, pelo amor dedicado a mim, pela ajuda nas tarefas do dia a dia e pela compreensão nos momentos de ausência.

As minhas colegas e amigas, por dividirem comigo essa jornada, animando ainda mais meus dias de UFRGS.

Às professoras Ligia e Giovana e à pós-doutoranda Júlia, pelos ensinamentos passados, e pela dedicação e paciência ao longo da elaboração deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologias e Processamento de Alimentos, pelos conselhos e ajuda durante meus trabalhos.

Resumo

O bagaço de uva é um resíduo gerado em grande quantidade no processo de fabricação de sucos e vinhos. Por ser rico em compostos fenólicos, torna-se interessante estudar métodos que melhorem a obtenção destes compostos, agregando valor comercial a esse resíduo. O presente trabalho otimizou o processo de extração assistida por ultrassom, sendo que os parâmetros avaliados foram o tempo de pré-tratamento e a altura de imersão da sonda, além da concentração de etanol e temperatura analisados através de um planejamento experimental. Com os resultados do planejamento experimental foi possível a construção de um modelo matemático e a obtenção de um ponto ótimo para a extração dos compostos fenólicos. A extração assistida por ultrassom com os parâmetros otimizados foi comparada às tecnologias convencionais de extração: moagem do bagaço de uva antes da extração, e a não utilização de pré-tratamento. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu. O teor de fenólicos totais foi determinado em ácido gálico equivalente (EAG/L), através da elaboração de uma curva de calibração. A intensidade de potência utilizada foi de 510 W cm^{-2} . As análises demonstraram um aumento na extração conforme o aumento do tempo de pré-tratamento: a aplicação de ultrassom por 15 minutos promoveu a extração de 1,5 vezes mais compostos fenólicos do que quando o pré-tratamento durou 10 minutos. A altura da sonda imersa também influenciou na quantidade de compostos fenólicos extraídos: com a sonda imersa por 3 cm foram obtidos 1,17 vezes mais compostos fenólicos do que quando a imersão foi de 1 cm. O planejamento experimental resultou em um modelo com R^2 de 0,984, significando que os parâmetros estudados descrevem suficientemente bem os resultados obtidos. A comparação entre as tecnologias nas condições ótimas demonstrou que a aplicação de ultrassom promove um aumento na extração dos compostos fenólicos de 2,5 vezes quando comparado ao experimento sem pré-tratamento. Porém, a moagem aumentou em 1,17 vezes a concentração de compostos fenólicos quando comparado com a aplicação do ultrassom. Com base nos resultados sugere-se uma avaliação econômica e energética tanto da moagem, quanto da aplicação do ultrassom, para definição de qual técnica empregar em processos de larga escala.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Morfologia do cacho de uva.....	3
Figura 2.2: Estrutura química: (a) ácido gálico (b) flavonóis.....	5
Figura 2.3: Estrutura química das principais antocianinas encontradas na uva: (a) petunidina (b) peonidina (c) malvidina (d) cianidina.	6
Figura 2.4: Extração de compostos fenólicos de diferentes variedades de bagaço de uva a 60 °C com diferentes solventes para as variedades Refošk (RF), Cabernet (CB), Merlot (ME) para: (a) compostos fenólicos totais (mg EAG/g bagaço B.S.) e (b) antocianinas totais (mg/g bagaço B.S.).	6
Figura 2.5: Faixas de frequência de som	8
Figura 2.6: Formação das bolhas de cavitação.	8
Figura 2.7: I Esquema do colapso da bolha de cavitação liberando compostos no meio. II Exemplo: extração do óleo de manjerição.	9
Figura 3.1: Bagaço de uva utilizado nos experimentos.....	10
Figura 3.2: Fluxograma da metodologia utilizada para definir a intensidade de potência do ultrassom.	11
Figura 3.3: Sistema de pré-tratamento com ultrassom.	12
Figura 3.4: Célula utilizada na etapa difusiva.....	13
Figura 3.5: Fluxograma do procedimento experimental adotado para definição do tempo de pré-tratamento.....	13
Figura 3.6: Fluxograma do procedimento experimental adotado para definição da melhor altura de imersão da sonda.	14
Figura 3.7: Delineamento composto central rotacional.	15
Figura 3.8: Sistema da etapa de difusão.	17
Figura 4.1: Curva analítica para cálculo das concentrações, com Folin 1.....	19
Figura 4.2: Concentração de compostos fenólicos totais ao longo do tempo de extração.	19
Figura 4.3: Concentração de compostos fenólicos pelo tempo, para diferentes tempos de pré-tratamento.....	21
Figura 4.4: Concentração de compostos fenólicos totais pelo tempo, para duas imersões de sonda.	22
Figura 4.5: Superfície de resposta para a concentração de fenólicos totais em função da concentração de etanol e da temperatura.	24
Figura 4.6: Comparação entre as tecnologias de pré-tratamento.....	26

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Produção de uvas para processamento e para consumo in natura, no Brasil, em 2012.	2
Tabela 2.2: Composição química da casca da uva.	3
Tabela 2.3: Composição química da semente da uva.	3
Tabela 2.4: Composição química da polpa da uva.	4
Tabela 2.5: Compostos fenólicos nas bagas de sete cultivares viníferas colhidas na safra de verão e inverno de 2007 em Cordislândia (MG).	4
Tabela 3.1: Planejamento experimental	15
Tabela 4.1: Resultados das análises após 60 minutos de difusão	20
Tabela 4.2: Resultados das análises após 30 minutos de difusão para a análise do tempo de pré-tratamento	21
Tabela 4.3: Resultado das análises após 30 minutos de difusão para o teste da altura da sonda	22
Tabela 4.5: Coeficientes de regressão e parâmetros para o modelo.	23
Tabela 4.6: Concentração de fenólicos totais para diferentes pré-tratamentos.	26

1 Introdução

O crescimento populacional dos centros urbanos tem gerado dois desafios para indústria: ter uma grande oferta de produtos e minimizar a produção de resíduos. Graças a isso tem crescido a pesquisa em torno da utilização de subprodutos que possam ser aproveitados em outros processos. Dentro destas pesquisas, destacam-se as que visam extrair compostos bioativos de subprodutos das indústrias de alimentos.

O Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional de uva e seus derivados. Em 2012 a quantidade de bagaço gerado no processamento da uva foi em torno de 160 mil toneladas, segundo estimativas da Embrapa. A grande quantidade de bagaço representa um problema ambiental e econômico para as vinícolas; atualmente a maior aplicação do bagaço tem sido a adubação do solo das parreiras, o que diminui consideravelmente o valor de mercado de um subproduto com um grande potencial. O bagaço de uva, composto basicamente por sementes e cascas, é rico em compostos fenólicos que possuem uma alta capacidade antioxidante. Tais compostos oferecem benefícios à saúde na prevenção de diversas doenças cardiovasculares e no retardo do envelhecimento celular.

Tendo em vista a obtenção destes compostos, é interessante estudar métodos de extração que prejudiquem menos o meio ambiente e agreguem valor aos resíduos. A aplicação de ultrassom pode melhorar a transferência de massa durante a extração dos compostos fenólicos, podendo diminuir o tempo de extração quando comparado aos métodos convencionais.

No presente trabalho serão estudadas melhorias ao processo de extração de compostos fenólicos do bagaço de uva realizados em estudos preliminares. O objetivo desse estudo é a avaliação de diferentes parâmetros de processo para otimizar a técnica de extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos do bagaço de uva. Nesse contexto, os objetivos específicos são:

- estudar diferentes tempos de pré-tratamento com o ultrassom;
- avaliar a melhor altura de imersão da sonda no solvente;
- realizar um planejamento experimental para encontrar um ponto ótimo de trabalho e um modelo estatístico que possibilite o cálculo da concentração de compostos fenólicos no extrato, em função da temperatura e da concentração de etanol,
- obter um extrato com alta concentração de compostos antioxidantes para ser aplicado nas indústrias de cosméticos, fármacos e alimentos.

2 Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre o bagaço da uva Merlot e também sobre compostos fenólicos. Serão ainda apresentados os princípios da extração sólido-líquido convencional e do funcionamento da tecnologia de ultrassom.

2.1 A uva

A uva é o fruto proveniente da videira, essa planta pertence ao gênero *Vitis*, família *Vitaceae*. A espécie de videira mais cultivada no mundo é a *Vitis vinifera*, apresentando diferentes cultivares de uvas para vinho tinto, uvas de mesa e uvas para produção de passas. As cultivares desta espécie são conhecidas como uvas finas (CAMARGO, 2015).

Dentre as 70 cultivares de uvas finas tintas existentes no Brasil, a uva Merlot é a segunda em importância pelo volume processado, ficando atrás apenas da Cabernet Sauvignon (CAMARGO, 2015).

2.1.1 Análise de mercado

Segundo dados do IBGE, em 2012 foram produzidas 1.455.809 toneladas de uva no Brasil. No mesmo ano, 830,92 milhões de quilos de uva, 57,07% da produção nacional, foram destinados ao processamento (Tabela 2.1). O Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90% da produção nacional de vinhos, sucos de uva e derivados, sendo possível tê-lo como base para uma boa aproximação do desempenho da agroindústria vinícola do país (MELLO, 2013).

Tabela 2.1: Produção de uvas para processamento e para consumo in natura, no Brasil, em 2012.

Discriminação	Quantidade (ton)
Processamento	830.915
Consumo in natura	624.894
Total	1.455.809

Fonte: adaptado de MELLO (2013).

2.1.2 Composição físico-química

O cacho da uva é composto pelo engaço (3% a 6% do cacho) e pelo bago (94% a 97% do cacho). A morfologia do cacho de uva é apresentada na Figura 2.1. Cada baga apresenta casca (8 a 20%), polpa (0 a 6%) e sementes (75 a 85%), sendo que essas porcentagens citadas são em relação ao peso fresco do bago.



Figura 2.1: Morfologia do cacho de uva.

Fonte: Federação da agricultura do estado do Paraná

Cada parte do bago apresenta uma composição diferente. Nas Tabelas 2.2 a 2.4 são apresentadas essas composições juntamente com as porcentagens, em relação ao peso fresco da bago, em que se apresentam. É possível observar nas tabelas que a casca, assim como a polpa, tem alto teor de água e que os compostos fenólicos estão presentes nas formas de taninos condensados e antocianinas nas três partes da uva, sendo a maior a concentração destes compostos na casca e nas sementes. Além disso, a semente é única parte do fruto que possui lipídios.

Tabela 2.2: Composição química da casca da uva.

Casca	
Componente	Quantidade (% peso fresco)
Água	78 – 80
Ácidos orgânicos	0,8 - 1,6
Taninos condensados	0,4 - 3
Antocianinas	0 - 0,5
Compostos nitrogenados	1,5 - 2,0
Ceras	1,0 - 2,0
Compostos de aroma	algumas µg

Fonte: adaptado de SILVA (2006).

Tabela 2.3: Composição química da semente da uva.

Semente	
Componente	Quantidade (% peso fresco)
Água	25 – 45
Açúcares	34 – 36
Taninos condensados	4,0 -10
Compostos nitrogenados	4,0 - 6,5
Minerais	2,0 - 4,0
Lipídios	13 -20

Fonte: adaptado de SILVA (2006).

Tabela 2.4: Composição química da polpa da uva.

Polpa	
Componente	Quantidade (% peso fresco)
Água	78 – 80
Monossacarídeos	10 - 25 (30)
Polissacarídeos	0,3 - 0,5
Ácidos orgânicos	0,9 - 2,7
Compostos fenólicos	0,05
Minerais	0,08 - 0,28
Vitaminas	0,025 - 0,08
Compostos de aroma	vestígios

Fonte: adaptado de SILVA (2006).

Os dados apresentados por Silva (2006) são referentes à espécie *Vitis vinifera* que possui uma grande variedade de cultivares. Estudos mostram que a composição físico-química da uva pode variar, tanto com a qualidade da uva, quanto com o período do ano em que a parreira é cultivada e, também, com o regime de podas empregado durante o cultivo (MOTA et al., 2010).

Mota et al. (2010) estudaram a influência do ciclo de produção, um de primavera-verão, compreendido entre agosto e janeiro, e o ciclo de outono-inverno, entre janeiro e julho, em diversas cultivares de uva em Cordislândia (MG). Os parâmetros de qualidade avaliados foram algumas características físico-químicas, tais como antocianinas e compostos fenólicos totais. A Tabela 2.5 apresenta os resultados dessas duas características para as cultivares estudadas. Observou-se que em todas as variedades estudadas, houve um aumento nos valores de antocianinas e fenólicos totais nas cascas e sementes na safra de inverno (MOTA et al., 2010).

Tabela 2.5: Compostos fenólicos nas bagas de sete cultivares viníferas colhidas na safra de verão e inverno de 2007 em Cordislândia (MG).

Variedade	Antocianinas (mg malvidina g(casca) ⁻¹)		Fenólicos (mg ac.gálico g(casca) ⁻¹)		Fenólicos (mg ac.gálico g(semente) ⁻¹)	
	verão	inverno	verão	inverno	verão	inverno
Pinot Noir	2,1 ± 0,1 B	2,6 ± 0,1 A	11,6 ± 0,5 B	14,4 ± 0,5 A	120,9 ± 4,5 A	139,4 ± 6,8 A
Tempranillo	2,7 ± 0,2 B	4,7 ± 0,2 A	10,3 ± 0,6 B	19,8 ± 1,1 A	72,0 ± 1,4 A	61,3 ± 5,3 A
Merlot	3,5 ± 0,1 B	4,3 ± 0,1 A	12,1 ± 0,6 B	13,9 ± 0,9 A	78,7 ± 4,2 B	95,1 ± 11,4 A
Cabernet Sauvignon	2,2 ± 0,1 B	6,2 ± 0,4 A	10,6 ± 0,7 B	19,7 ± 1,4 A	58,9 ± 5,8 B	93,0 ± 5,7 A
Syrah	7,4 ± 0,1 B	8,6 ± 0,3 A	22,8 ± 0,5 B	24,4 ± 2,0 A	74,9 ± 2,1 A	70,3 ± 6,2 A
Chardonnay			6,7 ± 0,2 B	6,7 ± 0,2 A	74,2 ± 4,5 A	75,7 ± 2,5 A
Sauvignon blanc			4,3 ± 0,1 B	6,8 ± 0,6 A	62,2 ± 2,9 A	65,8 ± 4,6 A

Dados representam a média de três repetições ± desvio-padrão.

Letras diferentes entre colunas (verão e inverno) diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: MOTA et al. (2010).

2.1.3 O bagaço de uva

Após a prensagem e o processamento para a vinificação, aproximadamente 20% do peso inicial de uva permanece na forma de bagaço. Com base na Tabela 2.1, é possível estimar que no ano de 2012 foram gerados mais de 160 mil toneladas de bagaço (MELO, 2010).

O bagaço é essencialmente composto pelo engaço, casca e sementes. Ele é constituído principalmente por água, cerca de 60-70%, alcoóis, principalmente etanol, metanol, glicerol e alcoóis superiores, aldeídos, ésteres, ácidos voláteis, polifenóis, taninos, proteínas, celulose, pectinas, sais minerais e resíduos de açúcar (ORRIOLS, 1994; RICE, 1976; FAMUYIWA e OUGH, 1982; SASTRE et al., 1994).

2.1.4 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são estruturas químicas que possuem hidroxilas e anéis aromáticos, podendo apresentar alto poder antioxidante. Estudos demonstram uma série de benefícios à saúde humana relacionados ao consumo de compostos com poder antioxidantes, como por exemplo: prevenção de cataratas, melhoria da sensibilidade à insulina, efeito anti-inflamatório e diversos efeitos ao sistema cardiovascular (AL-AWWADI et al., 2005; TERRA et al., 2007; YAMAKOSHI et al., 2002; ANGELO e JORGE, 2007; LEIFERT e ABEYWARDENA, 2008).

Os compostos fenólicos presentes em maior quantidade na uva incluem ácidos fenólicos (por exemplo, ácido gálico) e antocianinas (por exemplo, proantocianidinas). As estruturas de alguns desses compostos podem ser vistas nas Figuras 2.2 e 2.3. A quantidade, estrutura e grau de polimerização de proantocianidinas da uva diferem dependendo da sua localização nos tecidos da uva. Por exemplo, sementes de uva contêm concentrações maiores de 3-flavonóis monoméricos, oligoméricos e poliméricos em comparação às cascas da uva (LEIFERT e ABEYWARDENA, 2008).

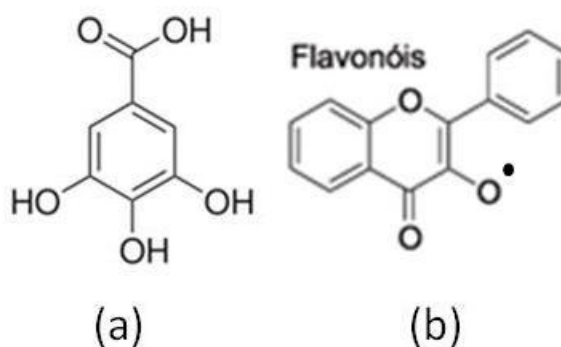


Figura 2.2: Estrutura química: (a) ácido gálico (b) flavonóis.

Fonte: adaptado de Fennema (1996).

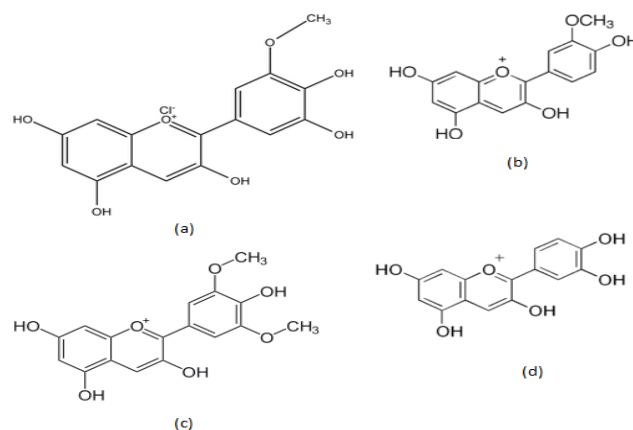


Figura 2.3: Estrutura química das principais antocianinas encontradas na uva: (a) petunidina (b) peonidina (c) malvidina (d) cianidina.
Fonte: adaptado de Fennema (1996).

A quantidade de compostos fenólicos também varia conforme o cultivar da uva. Vatai, Škerget e Knez (2009) estudaram a variação da quantidade de compostos fenólicos totais e de antocianinas no bagaço para diferentes variedades de uva e diferentes solventes e temperaturas aplicadas à extração. As variedades estudadas foram: Refošk, Cabernet e Merlot. Os compostos foram extraídos com água, acetona, acetato de etila e etanol, em diferentes concentrações. A Figura 2.4 apresenta o resultado das análises para a temperatura de 60°C.

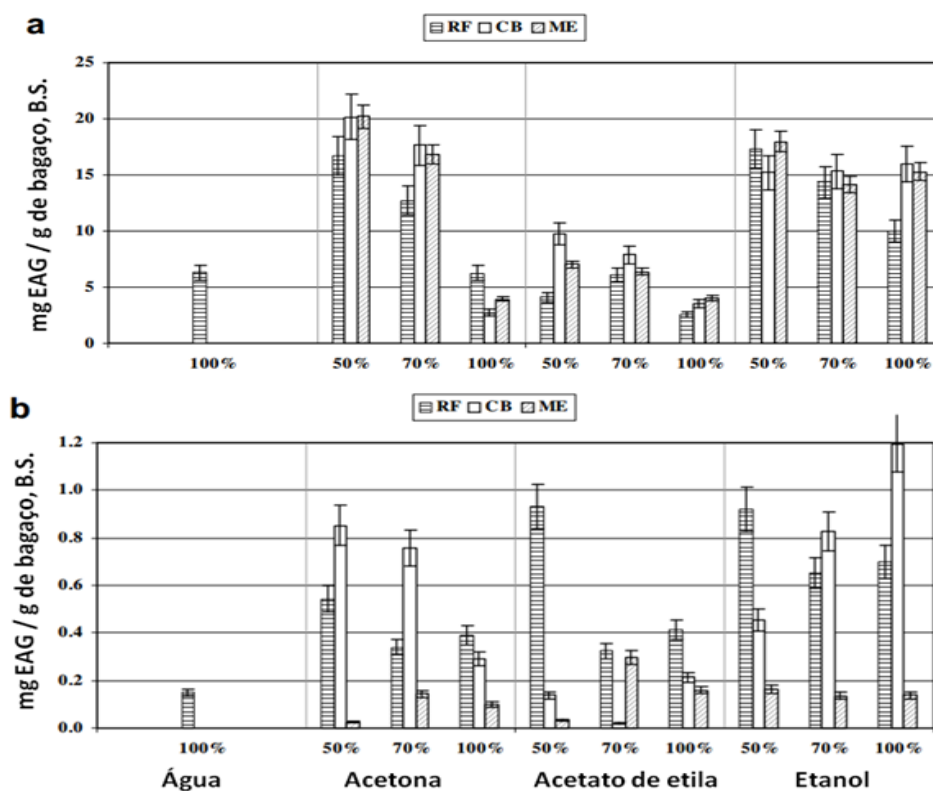


Figura 2.4: Extração de compostos fenólicos de diferentes variedades de bagaço de uva a 60 °C com diferentes solventes para as variedades Refošk (RF), Cabernet (CB), Merlot (ME) para: (a) compostos fenólicos totais (mg EAG/g bagaço B.S.) e (b) antocianinas totais (mg/g bagaço B.S.).
Fonte: adaptado de VATAI, ŠKERGET e KNEZ (2009).

Analisando a Figura 2.4 é possível perceber que a extração da maior quantidade de compostos fenólicos foi alcançada utilizando acetona 50 % (v/v), seguido pela utilização de etanol 50% (v/v). Para as antocianinas, as melhores condições foram alcançadas utilizando a concentração de 100% (v/v) de etanol. Comparando as variedades de uva é possível dizer que o bagaço de uva Merlot possui quantidades similares de compostos fenólicos às outras variedades estudadas, porém apresenta quantidades significativamente inferiores de antocianinas quando comparadas às outras duas variedades de bagaço. A quantidade e os tipos de compostos fenólicos presentes no bagaço de uva são, portanto, dependentes do cultivar. Outro fator que influencia na quantidade de compostos fenólicos é a época do ano em que é feito o cultivo das parreiras, conforme mostrado anteriormente na Tabela 2.5.

2.2 Extração convencional

A extração sólido-líquido, aqui chamada de extração convencional, envolve a remoção de um componente de interesse (soluto) de um alimento com o auxílio de um líquido (solvente) que é capaz de dissolver o soluto. Para que a retirada do soluto ocorra é necessário colocar o alimento em contato com o solvente por um tempo pré-determinado e em seguida separar o sólido e o solvente. Esse processo pode ocorrer em um único estágio ou em múltiplos estágios; é durante o período de contato que ocorre a transferência de massa do soluto, a partir da matriz do alimento, para o solvente. Esse processo ocorre nas três etapas descritas a seguir.

1. O soluto se dissolve no solvente.
2. A solução, contendo os compostos solúveis, se move através da partícula de alimento até a sua superfície.
3. A solução se torna dispersa no solvente.

Durante a extração, o tempo de contato deverá ser suficiente para o solvente dissolver o soluto e para que as alterações na composição se aproximem do equilíbrio. O tempo de retenção dependerá, além da solubilidade do soluto no solvente, dos seguintes fatores:

- temperatura de extração: quanto maior a temperatura maior a taxa de solutos que se dissolvem no solvente e maior também é a taxa de difusão para o solvente. A temperatura costuma ser limitada a 100°C por fatores econômicos, para dificultar a extração de componentes indesejados para o processo e também para evitar os danos causados pelo calor aos componentes termolábeis dos alimentos;
- área superficial dos sólidos: a taxa de transferência de massa é diretamente proporcional à área superficial, ou seja, a redução do tamanho de partícula aumenta a taxa de extração;
- viscosidade do solvente: essa deve ser suficientemente baixa para permitir que o solvente penetre mais facilmente no leito de partículas sólidas;
- fluxo de solvente: quanto maior for o fluxo de solvente, menor será a camada limite entre o sólido e o solvente, aumentando assim a taxa de transferência de massa (FELLOWS, 2006).

2.3 Extração assistida por ultrassom

O ultrassom consiste na emissão de ondas sonoras com uma frequência maior que a capacidade de audição do ouvido humano, como pode ser visto na figura a seguir, que apresenta as faixas de frequência do som (MASON et al., 2005).

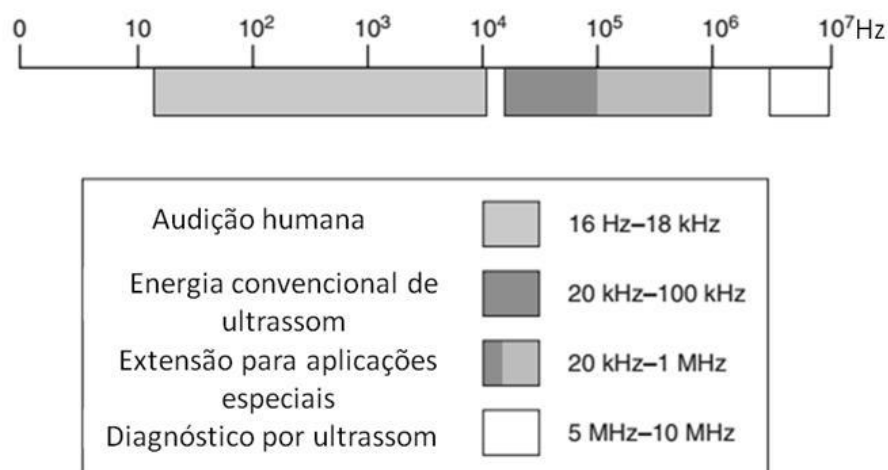


Figura 2.5: Faixas de frequência de som
Fonte: adaptado de MASON et al.,(2005)

O movimento das ondas ultrassônicas no líquido gera zonas de compressão e rarefação, devido à incompressibilidade do meio. Com uma potência suficientemente alta, os ciclos de rarefação podem exceder as forças atrativas das moléculas do líquido, e bolhas são formadas. As bolhas distribuídas em todo o líquido, crescem durante o período de alguns ciclos até um tamanho de equilíbrio para a frequência aplicada. A figura a seguir apresenta um esquema da formação e do crescimento das bolhas (MASON et al., 2005).



Figura 2.6: Formação das bolhas de cavitação.
Fonte: MO (2012).

Se as bolhas fossem sujeitas apenas à frequência, permaneceriam como bolhas oscilatórias (expandindo e contraindo); no entanto, o movimento das ondas em direções diferentes influencia todas as milhares de bolhas no meio que são geradas na cavitação. Cada bolha afeta o campo das bolhas vizinhas e, sob tais circunstâncias, as bolhas ficarão instáveis e entrarão em colapso. Esse colapso gera a energia para os efeitos químicos e mecânicos do ultrassom: cada bolha em colapso atua como um “ponto quente” localizado, gerando uma temperatura de cerca 4000 K e pressões superiores a 1000 atm (MASON et al., 2005).

As bolhas colapsadas, distribuídas pelo meio, têm uma variedade de efeitos no sistema dependendo do tipo de material envolvido. No caso de sistemas de sólidos e líquidos, o colapso da bolha perto da superfície pode aumentar a transferência de massa e de calor, devido à ruptura das camadas-limites presentes na interface do sistema. A cavitação também pode produzir efeitos sobre os sólidos: imperfeições superficiais ou gases aprisionados podem agir como núcleos para a formação das bolhas e o choque provocado pelo seu colapso pode levar a ruptura das partículas. Essa ruptura pode ocorrer também graças aos microjatos de alta pressão que são lançados em direção ao sólido. Em ambos os casos, a ruptura das células facilita a saída dos compostos do seu interior para o meio extrator (MASON et al., 2005).

A Figura 2.7 mostra a formação de uma bolha próxima à superfície do sólido (a), o colapso da bolha e a criação do microjato voltado para o sólido (b e c) e a liberação do conteúdo para o meio (d) e também uma microscopia eletrônica de varredura do momento em que ocorre o colapso da bolha liberando óleo de manjeriço.

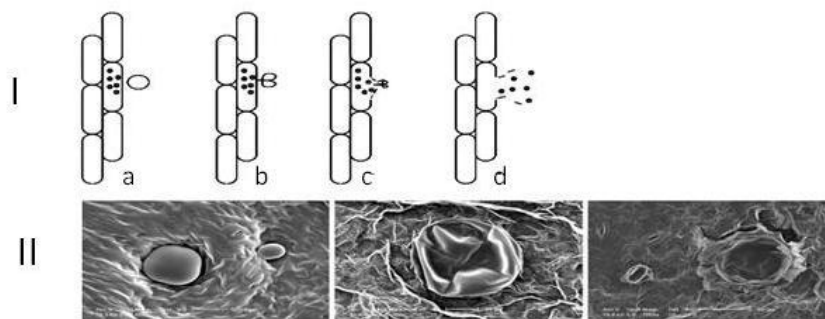


Figura 2.7: I Esquema do colapso da bolha de cavitação liberando compostos no meio.

II Exemplo: extração do óleo de manjeriço.

Fonte: CHEMAT, ZILL-E-HUMA e KHAN (2011).

Da Porto, Porretto e Decorti (2013) estudaram os efeitos do ultrassom como auxiliar, primeiramente, na remoção do óleo das sementes de uva, comparando com o uso do extrator Soxhlet. O ultrassom (frequência do aparelho de 20 kHz) se mostrou eficiente, já que aplicando 150 W por 30 minutos com 200 mL de n-hexano, extraíram-se quantidades de óleo semelhantes às quantidades obtidas pela extração com Soxhlet durante 6 horas com 300 mL de n-hexano. As sementes desengorduradas por ambos os métodos foram moídas para a extração de compostos fenólicos por duas metodologias: a extração sólido-líquido convencional e a extração assistida por ultrassom. A extração convencional foi realizada utilizando 150 mL de metanol, a temperatura ambiente por 12 horas. A extração assistida por ultrassom utilizou 100 mL de metanol, aplicando uma potência de 150 W durante 15 minutos, com controle da temperatura abaixo de 30°C. Após a análise dos resultados, concluiu-se que a extração dos compostos fenólicos dependeu de como as sementes tinham sido desengorduradas, sendo que o maior rendimento foi para as sementes desengorduradas com o auxílio do ultrassom. Comparando-se as duas metodologias de extração dos compostos fenólicos, observou-se que a extração assistida por ultrassom obteve resultados semelhantes à convencional, porém utilizou menor quantidade de solvente e menor tempo para a extração (DA PORTO; PORRETTO; DECORTI, 2013).

3 Materiais e Métodos

Este capítulo irá tratar sobre os materiais e métodos utilizados para a elaboração deste trabalho. Primeiramente, será apresentada a matéria-prima utilizada, seguida pela apresentação das análises dos parâmetros da tecnologia de ultrassom. Posteriormente, será descrito o planejamento experimental usado para a otimização do processo, e, por fim, são descritas as análises químicas e estatísticas realizadas.

3.1 Bagaço de uva

O bagaço de uva utilizado nos experimentos foi fornecido pela vinícola Salton, localizada no município de Bento de Gonçalves, RS. O bagaço, proveniente do processo de fabricação de vinhos, corresponde ao cultivar Merlot (*Vitis vinifera*) da safra de 2015. O bagaço, recolhido em janeiro de 2015, ainda na vinícola, passou por uma adição de dióxido de enxofre. Após a coleta, para sua conservação, ele foi armazenado sob-refrigeração. O teor de umidade do bagaço foi 52,95% (m/m) e foi utilizado para expressar os resultados em base seca.

A massa de bagaço para cada extração foi de, aproximadamente, 15 g, sendo composta basicamente por casca e sementes, conforme mostra a Figura 3.1. Durante a pesagem, realizada em balança analítica (Shimadzu, modelo AY220, Kyoto, Japão), não houve qualquer método para controlar as quantidades específicas de cascas e sementes para cada experimento.



Figura 3.1: Bagaço de uva utilizado nos experimentos.

3.2 Análise da intensidade do ultrassom

A análise da intensidade do ultrassom já havia sido realizada em um trabalho anterior; Gobo (2014) avaliou a cinética de extração de compostos fenólicos em três diferentes intensidades de potência de ultrassom: 170, 340 e 510 W cm⁻². O ultrassom foi utilizado como um pré-tratamento e foi comparado com a moagem e a extração sem a utilização de pré-tratamentos. O estudo revelou que a aplicação do ultrassom aumenta o rendimento da extração, chegando a resultados semelhantes aos da moagem como pré-tratamento. Os experimentos de Gobo (2014) foram repetidos da mesma forma no presente trabalho devido apenas à mudança de safra da uva. Se os resultados não fossem da mesma safra, não poderiam ser feitas comparações com os experimentos posteriores.

A Figura 3.2 apresenta esquematicamente o procedimento para análise da intensidade de potência do ultrassom.

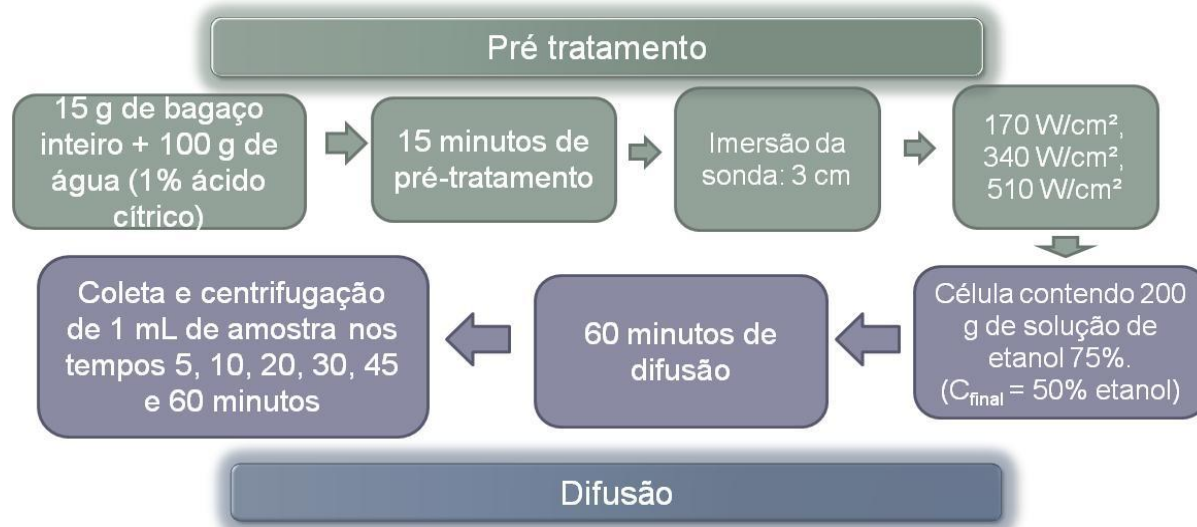


Figura 3.2: Fluxograma do procedimento experimental adotado para definir a intensidade de potência do ultrassom.

3.3 Análise do tempo de pré-tratamento e da altura de imersão da sonda

A análise do tempo de pré-tratamento e imersão da sonda são importantes para verificar como esses dois parâmetros afetam a extração dos compostos fenólicos.

Os experimentos de extração assistida por ultrassom contam com duas etapas, uma de pré-tratamento com a aplicação do ultrassom e em seguida uma etapa de difusão. Aqui será apresentada primeiramente a metodologia aplicada na etapa de pré-tratamento, tanto para a avaliação do tempo de pré-tratamento, quanto para a avaliação da altura de imersão da sonda, e, em seguida, a metodologia aplicada na etapa de difusão.

O equipamento de ultrassom utilizado foi do tipo sonda (Sonics & Materials Inc., modelo VCX750, Newtown, Estados Unidos). Neste experimento o bagaço foi submetido a 20 kHz (frequência fixa do equipamento) e a intensidade de potência de 510 W cm^{-2} , que corresponde a 90% da capacidade nominal do equipamento. Essa potência foi escolhida através dos experimentos descritos na seção 3.2.

3.3.1 Análise do tempo de pré-tratamento

Em uma célula de vidro encamisada, com 9 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro, foram adicionados 100 g de água acidificada com 1% (m/m) de ácido cítrico (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Diadema, Brasil). Para que a temperatura não ultrapassasse 30°C a célula foi conectada a um banho termostático (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, modelo Alpha RA 12, Lauda-Königshofen, Alemanha). Visto que a aplicação do ultrassom causa um aquecimento do meio ao longo tempo, foram realizados testes para definir qual a temperatura do banho para cada tempo de pré-tratamento testado. A Figura 3.2 mostra uma fotografia do sistema de ultrassom com o banho termostático utilizado.

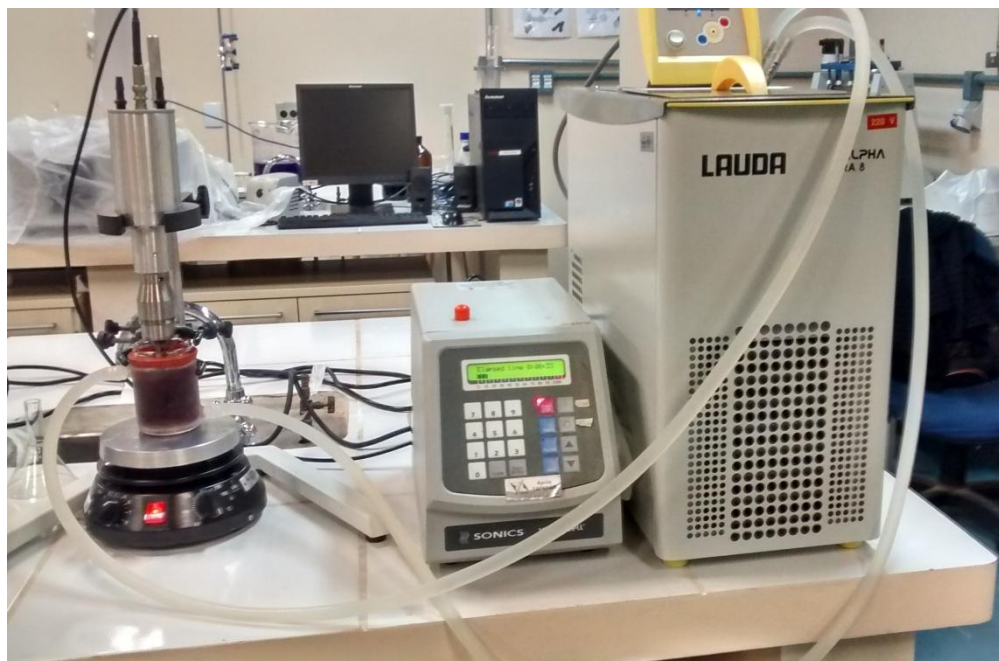


Figura 3.3: Sistema de pré-tratamento com ultrassom.

A célula foi posicionada sobre um agitador magnético (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, modelo 752^a, São Paulo, Brasil) e agitada durante todo o experimento. Quando a temperatura da solução atingiu a mesma temperatura do banho, a amostra foi adicionada à célula, a sonda foi submersa por 3 cm e o equipamento acionado. Testaram-se os tempos de 5 minutos e 10 minutos; ao final do tempo de pré-tratamento uma alíquota de 1 mL, aproximadamente, foi coletada em eppendorf e centrifugadas por 3 minutos a 12100 g em uma centrífuga (Eppendorf AG, modelo MiniSpin®, Hamburgo, Alemanha). Ao término da centrifugação o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer para posterior análise. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.2 *Análise da altura de imersão da sonda*

Para analisar a altura de imersão da sonda, o procedimento adotado foi o mesmo descrito no item anterior, com a diferença de que a sonda foi imersa 1 cm na célula e o pré-tratamento foi realizado por 15 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram comparados com o experimento anterior para verificar qual a melhor distância de imersão, 1 ou 3 cm.

3.3.3 *Etapa de difusão*

Depois de terminado o tempo de pré-tratamento, o conteúdo da célula foi vertido para outra célula de vidro encamisada, com 12 cm de altura e 8 cm de diâmetro, com tampa de borracha.

A célula, contendo 200 g de uma solução de etanol 75 % (v/v) acidificada com 1 % (m/m) de ácido cítrico e mais o conteúdo da célula de pré-tratamento, foi posicionada sobre um agitador magnético (IKA C Mag, modelo HS 7, Staufen, Alemanha) e conectada a um banho de aquecimento (Cole-Parmer, Polystat PPO, Illinois, Estados Unidos) para manter a temperatura de 30°C. A concentração de etanol foi calculada de modo que a solução de extração na etapa difusiva tivesse uma concentração de etanol de 50%. A

Figura 3.4 apresenta a célula utilizada na etapa difusiva, sobre o agitador e conectada ao banho de aquecimento.

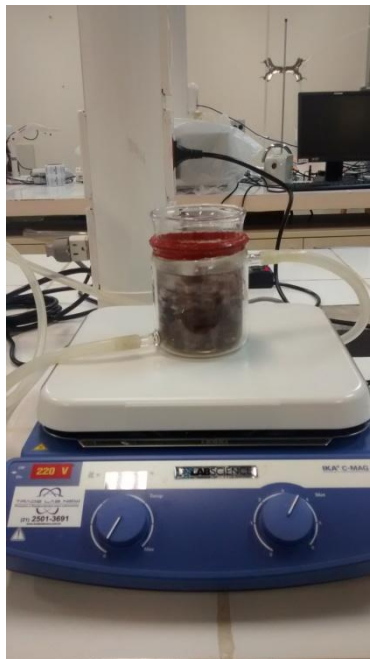


Figura 3.4: Célula utilizada na etapa difusiva.

Quatro alíquotas de aproximadamente 1 mL foram coletadas ao longo dos 30 minutos, nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos. As amostras coletadas foram centrifugadas e armazenadas em freezer para posterior análise. O tempo de armazenamento das amostras não foi superior a 3 dias.

As Figuras 3.5 e 3.6 apresentam esquematicamente o procedimento experimental tanto para a análise de tempo de pré-tratamento e da altura de imersão da sonda.

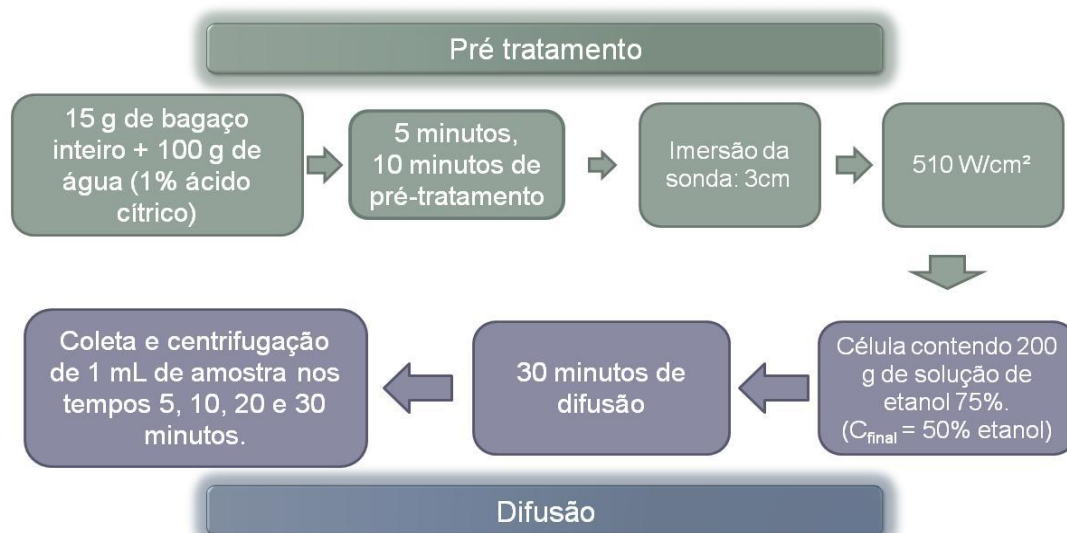


Figura 3.5: Fluxograma do procedimento experimental adotado para definição do tempo de pré-tratamento.

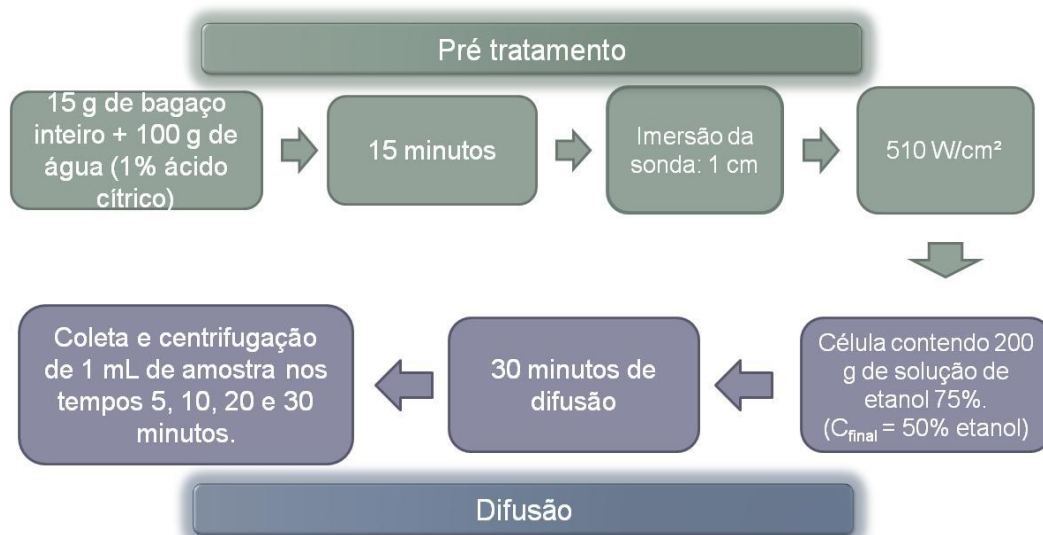


Figura 3.6: Fluxograma do procedimento experimental adotado para definição da melhor altura de imersão da sonda.

3.4 Planejamento experimental

Foi utilizado um planejamento experimental para avaliar a influência de duas variáveis independentes na concentração de compostos fenólicos extraídos do bagaço de uva. As variáveis analisadas foram: concentração de etanol na solução extratora e temperatura na etapa de difusão. O planejamento dos experimentos foi realizado utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR), que é recomendando para experimentos fatoriais com 2 fatores independentes (Rodrigues e lemma, 2005). Com a análise feita a partir do DCCR, é possível obter os efeitos de cada variável, verificar quais parâmetros exercem influência significativa no modelo, avaliar interações entre as variáveis, além de obter uma superfície de resposta a partir dos experimentos. Foi realizado um fatorial completo 2^2 , com a inserção de 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central para a avaliação do erro puro dos experimentos. A Figura 3.7 apresenta a distribuição dos pontos do planejamento central, onde α são os pontos axiais. A Tabela 3.1 apresenta os valores codificados e os originais das variáveis estudadas no planejamento experimental. Além disso, é possível observar que os experimentos foram realizados em diferentes dias, de forma aleatória para que isso não interferisse nos resultados.

O limite inferior da faixa de temperatura foi fixado em 30°C, por esta ser a temperatura que a amostra atinge após 15 minutos de aplicação do ultrassom. O limite superior foi fixado em 70°C para não se atingir a temperatura de ebulição do etanol e assim diminuir as perdas de solvente ao longo do experimento; por motivo semelhante, o limite superior da concentração de etanol foi fixado em 80% (v/v) de etanol. O limite inferior de concentração de etanol foi 0%, ou seja, o uso apenas de água como solvente. Todas as soluções foram acidificadas com 1 % (m/m) de ácido cítrico (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil).

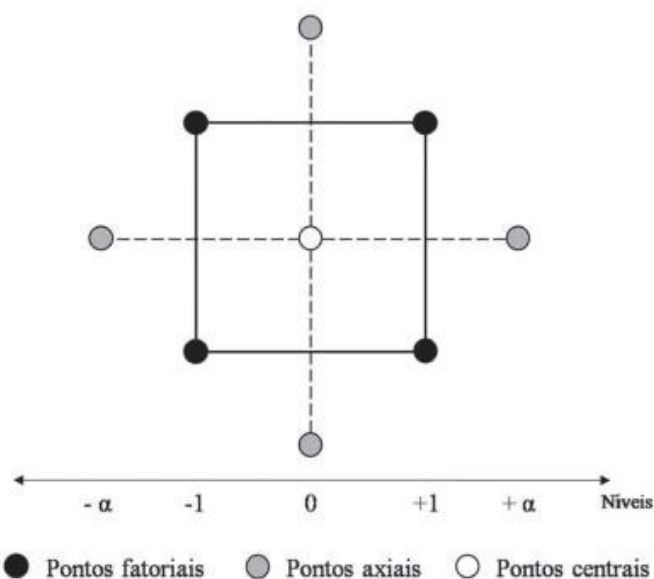


Figura 3.7: Delineamento composto central rotacional.
Fonte: Portal Metálica (2015).

Tabela 3.1: Planejamento experimental

Experimentos	Variáveis codificadas		Variáveis reais		
	T	EtOH	T (°C)	EtOH (% v/v)	Dias
1	-1	-1	36	12	Dia 1
2	-1	1	36	68	Dia 2
3	1	-1	64	12	Dia 3
4	1	1	64	68	Dia 4
5	-1,41	0	30	40	Dia 5
6	1,41	0	70	40	Dia 6
7	0	-1,41	50	0	Dia 5
8	0	1,41	50	80	Dia 6
9	0	0	50	40	Dia 1
10	0	0	50	40	Dia 2
11	0	0	50	40	Dia 3

Para analisar estatisticamente a concentração de compostos fenólicos no extrato, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta através do software *Statística*® versão 7 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos). A modelagem dos dados experimentais foi realizada com base no modelo representado na equação:

$$C = \alpha_0 + \alpha_1 T + \alpha_2 T^2 + \alpha_3 Et + \alpha_4 Et^2 + \alpha_5 T Et \quad (3.1)$$

onde α são os coeficientes de regressão, C é a variável de resposta (concentração de compostos fenólicos totais), T é a variável independente temperatura e Et a variável independente concentração de etanol.

O erro médio do modelo foi calculado através da equação:

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|C_{exp} - C_{calc}|}{y_{exp}} \quad (3.2)$$

onde E é o erro médio, n é o número de pontos experimentais, C_{exp} é a concentração de compostos fenólicos obtida experimentalmente e C_{calc} são os valores preditos pelo modelo.

Através do modelo obtido, foi possível determinar um ponto ótimo de operação do sistema.

Os parâmetros fixados para os experimentos foram:

- intensidade de potência do ultrassom: 510 W cm⁻²
- tempo de pré-tratamento: 15 min;
- imersão da sonda: 3 cm
- ratio no pré-tratamento: 15/100, g/mL
- temperatura do banho pré-tratamento: 4°C
- temperatura da amostra pré-tratamento: 30°C
- tempo de difusão: 30 min
- ratio na difusão: 15/300, g/mL

Ao final dos 30 minutos de difusão, uma alíquota de 1 mL foi recolhida, centrifugada e armazenada para posterior análise.

Nos experimentos do planejamento experimental, a concentração de etanol foi mantida constante entre o pré-tratamento e a etapa de difusão. Como a concentração de etanol foi maior que nos experimentos anteriores, para evitar a evaporação do solvente na etapa de difusão, foi utilizada uma célula de vidro que possui com um adaptador para condensador. Esse adaptador foi fechado por uma tampa de silicone. A célula encamisada, com 11 cm de altura e 10 cm de diâmetro, foi conectada ao banho de aquecimento e posicionada sobre agitador magnético, conforme mostra a Figura 3.5.

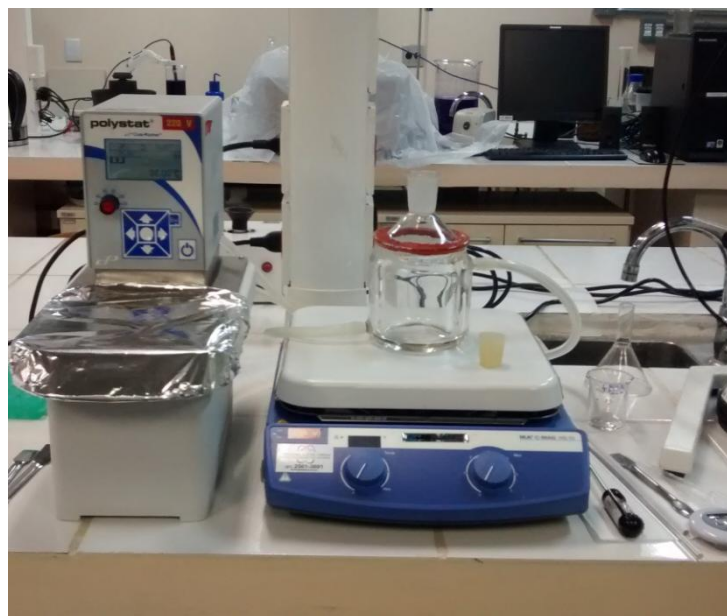


Figura 3.8: Sistema da etapa de difusão.

3.5 Experimento para comparação de tecnologias

Foram realizados experimentos com diferentes pré-tratamentos para comparar os resultados obtidos com o ultrassom: o controle, com intensidade de potência de ultrassom zero, e a moagem do bagaço de uva. Ambos os experimentos foram realizados nas condições ótimas de temperatura e concentração de etanol determinadas no planejamento experimental.

3.5.1 Controle

Para o experimento controle, o mesmo procedimento do planejamento foi adotado, porém o ultrassom permaneceu desligado durante os 15 minutos de pré-tratamento.

3.5.2 Moagem

O bagaço foi moído utilizando um mixer (Black & Decker, SB40, Maryland, Estado Unidos) até atingir tamanho de partícula menor que 2,83 mm. Foram pesadas 15 g de bagaço, adicionados à célula de vidro contendo 300 g da solução extratora e deixados sob agitação durante 30 minutos.

3.6 Análises laboratoriais

As análises para determinação de fenólicos totais foram feitas com base no método colorimétrico Folin-Ciocalteu (FC), proposto por Waterhouse L. (2001) com algumas modificações. Foram misturados 50 μ L de amostra, verificando a necessidade de diluição prévia da amostra, com 2,6 mL de água e 250 μ L de reagente de Folin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), agitado em vórtex e aguardado 5 minutos. Então, foi misturado à solução 1950 μ L de solução aquosa de 7,14 % (m/m) de carbonato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Diadema, Brasil). A amostra foi agitada em vórtex e deixada por duas horas ao abrigo da luz. Passadas as duas horas foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm (PG Instruments Ltd., T80 UV/VIS Spectrometer, Leicestershire, Inglaterra). O branco utilizado continha o solvente de extração com a concentração de etanol conforme o experimento.

Os valores de absorbância lidos foram utilizados para calcular a concentração de compostos fenólicos totais através de uma curva analítica com as concentrações 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm de ácido gálico, dissolvido em solução de etanol 50 % (v/v). As curvas analíticas foram feitas em duplicata.

3.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* Statistica® versão 7 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos). Os valores médios obtidos para o tempo de 30 minutos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) com grau de significância de 95 %. Com essas análises, foi possível determinar a significância estatística dos resultados e obter uma comparação entre os experimentos.

4 Resultados

Este capítulo apresenta os resultados deste trabalho.

4.1 Curva analítica dos compostos fenólicos

Foram elaboradas duas curvas analíticas, conforme descrito no item 3.5, devido à mudança de lote do reagente de Folin-Ciocalteu durante a execução dos experimentos. A Figura 4.1 mostra a curva obtida e a Equação 4.1 apresenta a regressão linear, sendo C a concentração de compostos fenólicos em mg EAG/mL e A é a absorbância lida no espectrofotômetro. O coeficiente de determinação, R^2 , encontrado foi de 0,9990. As duas curvas analíticas elaboradas apresentaram comportamento semelhante.

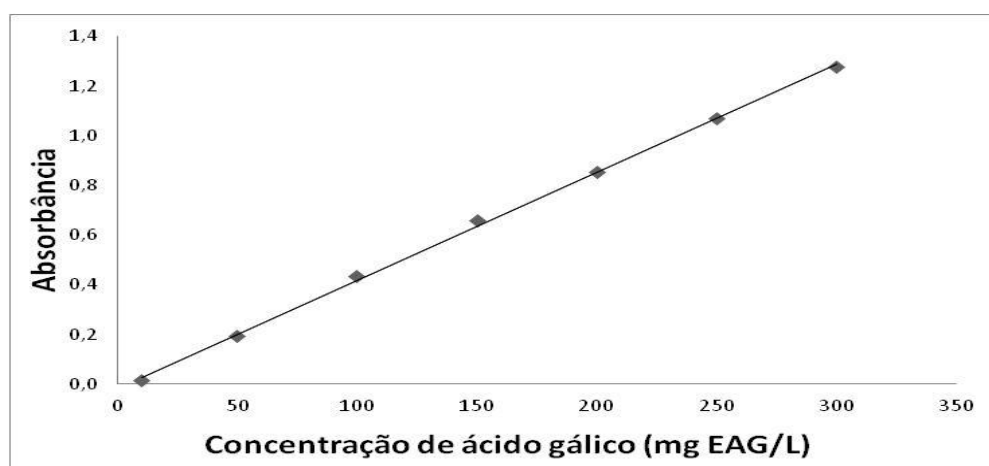


Figura 4.1: Curva analítica para cálculo das concentrações, com Folin 1.

$$A = 0,0043xC - 0,0151 \quad (4.1)$$

4.2 Análise da intensidade de potência do ultrassom

Os resultados apresentados nesta seção são referentes à repetição dos experimentos realizados por Gobo (2014). A Figura 4.2 apresenta o gráfico da concentração de compostos fenólicos (em miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 g de bagaço) em função do tempo de extração para os diferentes experimentos realizados.

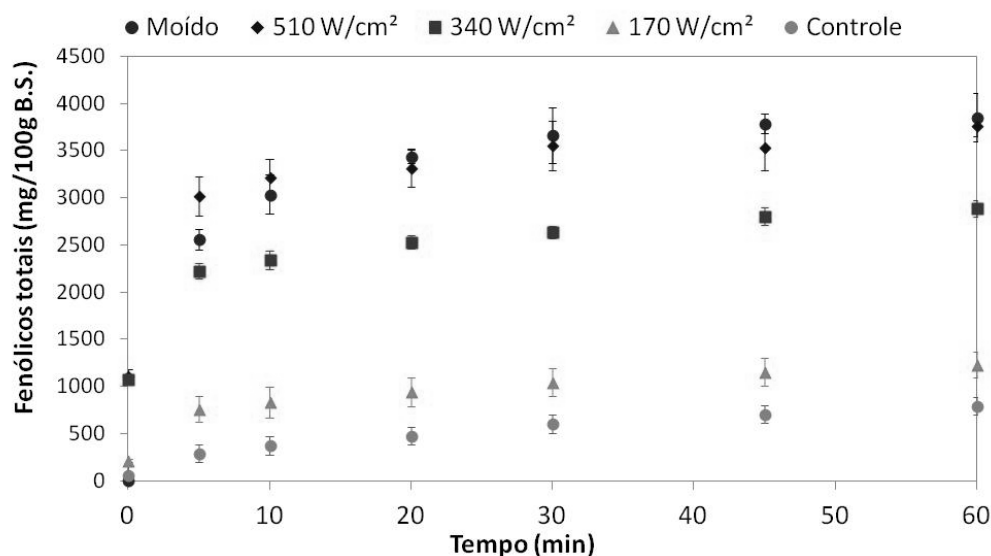


Figura 4.2: Concentração de compostos fenólicos totais ao longo do tempo de extração.

É possível perceber que houve um aumento na quantidade de compostos fenólicos totais conforme o aumento da intensidade de potência do ultrassom. A intensidade de potência mais alta, 510 W cm^{-2} , equipara-se com a moagem do bagaço como pré-tratamento. Esses experimentos repetem os resultados obtidos por GOBO, (2014), sendo assim a intensidade de potência utilizada em todos os próximos experimentos foi mantida em 510 W/cm^2 .

Para avaliar estatisticamente o comportamento observado na Figura 4.2, foi realizada uma comparação entre as concentrações de compostos fenólicos, após os 60 minutos de difusão. A Tabela 4.1 mostra a quantidade de fenólicos totais.

Tabela 4.1: Resultados das análises após 60 e 30 minutos de difusão

	Compostos fenólicos (mgEAG/100gB.S.) após 60 min difusão	Compostos fenólicos (mg EAG/ 100g B.S.) após 30 min difusão
170 W cm^{-2}	1229 ± 138 ^{c,C}	1045 ± 149 ^{c,C}
340 W cm^{-2}	2889 ± 88 ^{b,B}	2634 ± 70 ^{b,B}
510 W cm^{-2}	3760 ± 111 ^{a,A}	3553 ± 266 ^{a,A}

^{a, b, c} índices diferentes nas linhas mostra que houve diferença significativa nos resultados quando realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$)

^{A, B, C} índices diferentes nas colunas mostra que houve diferença significativa nos resultados quando realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Foi realizada, ainda, uma análise de variância (ANOVA) para a quantidade de compostos fenólicos dos tempos 30 e 60 minutos, na intensidade de potência de 510 W/cm^2 , que demonstrou que não existe uma diferença significativa entre essas quantidades ($p > 0,05$); portanto, para os próximos experimentos, a etapa de difusão teve duração de 30 minutos.

4.3 Análise do tempo de pré-tratamento

Foram testados os tempos de pré-tratamento de 5 e 10 minutos, e estes foram comparados com experimento realizado por 15 minutos no teste da intensidade de potência. A Figura 4.3 mostra a concentração de compostos fenólicos para as condições avaliadas

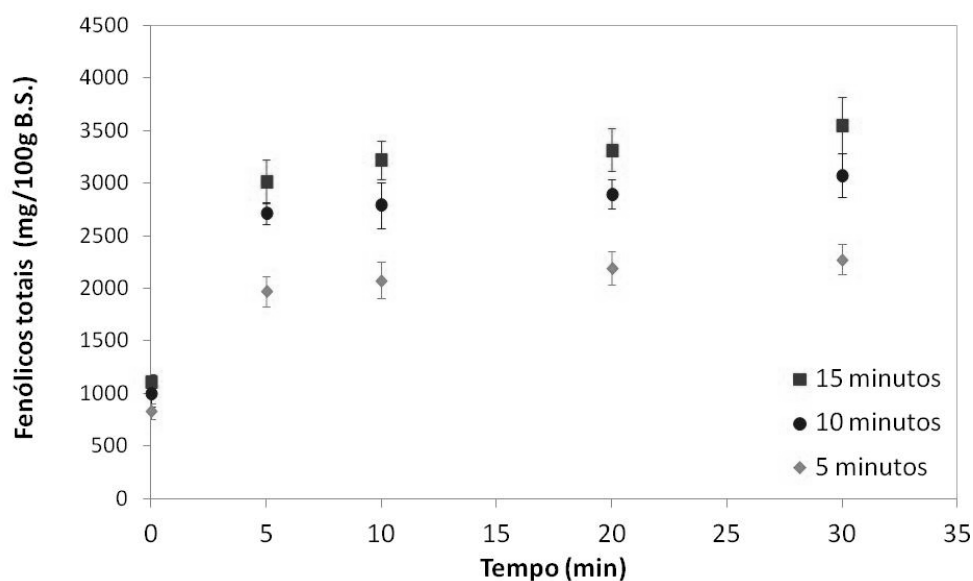


Figura 4.3: Concentração de compostos fenólicos pelo tempo, para diferentes tempos de pré-tratamento.

A análise estatística para comparar os valores de cada experimento (ANOVA) mostrou que houve diferença significativa entre todos os experimentos após 30 minutos de difusão e que o experimento conduzido por 15 minutos de pré-tratamento extraiu uma maior quantidade de compostos fenólicos. A comparação pode ser vista na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Resultados das análises após 30 minutos de difusão para a análise do tempo de pré-tratamento

	Compostos fenólicos (mgEAG/100gB.S.)
5 minutos	2275 ± 145 ^c
10 minutos	3078 ± 204 ^b
15 minutos	3553 ± 266 ^a

^{a, b, c,} Índices diferentes mostram que houve uma diferença significativa nos resultados quando realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$).

González-Centeno et al. (2014) estudaram o efeito da frequência acústica, da intensidade de potência e do tempo de aplicação de ultrassom na extração de compostos fenólicos do bagaço de uva. Os tempos estudados foram 5, 15 e 25 minutos de extração, sendo todo o tempo de extração corresponde à aplicação do ultrassom. A maior concentração de compostos fenólicos encontrada foi de 25,8 mg EAG/100 g de bagaço com 25 minutos de extração, utilizando apenas água como solvente.

4.4 Análise da altura de imersão da sonda

Com dois parâmetros já definidos, intensidade de potência de 510 W/cm² e tempo de pré-tratamento de 15 minutos, foi testada a altura de imersão da sonda, ou seja, quantos centímetros da sonda estão imersos no líquido. Os experimentos anteriores tinham uma imersão de 3 cm e testou-se então uma imersão menor da sonda, de 1 cm. Os resultados são mostrados na Figura 4.4.

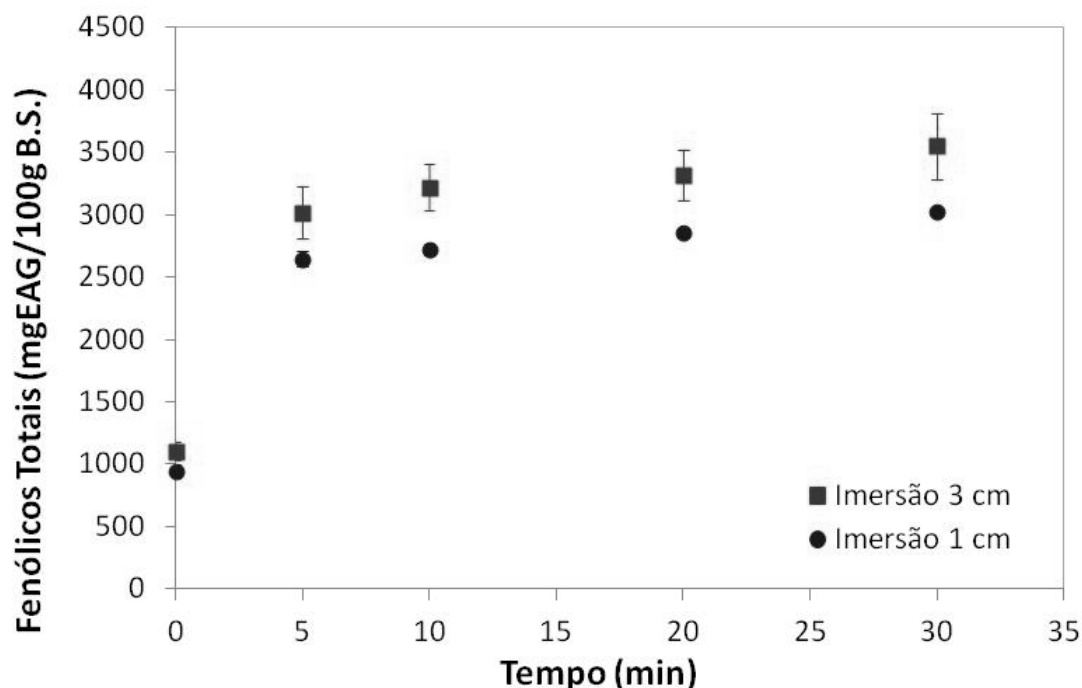


Figura 4.4: Concentração de compostos fenólicos totais pelo tempo, para duas imersões de sonda.

Pela análise deste gráfico é possível perceber a diferença entre a maior e a menor altura de imersão. Os resultados das análises, após 30 minutos de difusão, podem ser observados na Tabela 4.3. De acordo com a ANOVA, a imersão de 3 cm aumenta a quantidade de compostos fenólicos extraídos quando comparada com a imersão de 1 cm, devido à turbulência gerada no líquido estar mais próxima das partículas que, mesmo com a agitação constante, tendem a permanecer no fundo da célula.

Tabela 4.3: Resultado das análises após 30 minutos de difusão para o teste da altura da sonda

Concentração de compostos fenólicos (mgEAG/100g B. S.)	
Imersão de 1 cm	3030 ± 4^b
Imersão de 3 cm	3553 ± 265^a

^{a, b}, Índices diferentes mostram que houve uma diferença significativa nos resultados quando realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A altura da sonda foi, então, mais um parâmetro definido antes da realização do planejamento experimental para a determinação do melhor binômio concentração de etanol-temperatura.

Liu et al. (2013) utilizaram o ultrassom como auxiliar na microfiltração de extratos de bagaço de uva. A imersão da sonda de ultrassom foi avaliada em relação à distância da membrana de microfiltração. O resultado obtido demonstrou que quanto mais imersa a sonda, mais forte era o efeito de turbulência gerado pelas ondas de ultrassom no líquido. Esse fenômeno justifica o aumento na extração dos compostos fenólicos com a imersão de 3 cm.

4.5 Planejamento experimental

Utilizando os resultados da Tabela 4.4 foi realizada uma regressão para o modelo da Equação (3.1). Além disso, uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar a significância de cada fator e de suas interações. Os coeficientes de regressão, o coeficiente de determinação (R^2), o valor F do modelo e o erro médio entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo, dado pela Equação (3.2), são apresentados na Tabela 4.5. O modelo final proposto considera apenas as influências de fatores significativos ($p < 0,05$), assim os efeitos insignificantes estão ausentes nas equações e não foram considerados no gráfico de superfície de resposta. Os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 4.5 são válidos para variáveis na sua forma codificada. O erro puro, entre as repetições do ponto central, foi de 4,84%, sendo esse valor considerado satisfatório. Todas as análises foram realizadas para os valores de concentração de compostos fenólicos ao final da difusão, após 30 min.

Tabela 4.4: Variáveis do planejamento na forma original e codificada e os resultados experimentais (\pm DP) para a variável de resposta, fenólicos totais (FT).

T ^a (°C)	EtOH ^a (% v/v)	FT ^b (mg EAG/100g)
36 (-1)	12 (-1)	1265 \pm 36
36 (-1)	68 (1)	2529 \pm 94
64 (1)	12 (-1)	2815 \pm 22
64 (1)	68 (1)	3838 \pm 107
30 (-1,41)	40 (0)	2885 \pm 142
70 (1,41)	40 (0)	4294 \pm 21
50 (0)	0 (-1,41)	1017 \pm 41
50 (0)	80 (1,41)	2381 \pm 78
50 (0)	40 (0)	3867 \pm 64
50 (0)	40 (0)	3717 \pm 50
50 (0)	40 (0)	4212 \pm 78

^a os valores em parênteses correspondem às variáveis em sua forma codificada.

^b os resultados são apresentados em base seca.

Tabela 4.5: Coeficientes de regressão e parâmetros para o modelo.

	Coeficientes	Valor-p
Linear	3721,93	>0,001
T (L)	637,05	0,010
T (Q)	-	-
Et (L)	527,73	0,015
Et (Q)	-1048,52	0,005
TxEt	-	-
R^2	0,984	
F _{modelo}	149,76	
E (%)	4,55	

O coeficiente de determinação R^2 apresentou um valor satisfatório, demonstrando que as variáveis independentes estudadas representam bem as variações na

concentração de fenólicos. O erro do modelo, que representa a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores obtidos através do modelo, apresentou um valor relativamente baixo de 4,55%.

A visualização do modelo obtido pode ser feita através de uma superfície de resposta, que relaciona as duas variáveis independentes com a variável de resposta. A superfície foi obtida através do *software* Statistica® 7 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos) e é apresentada na Figura 4.5.

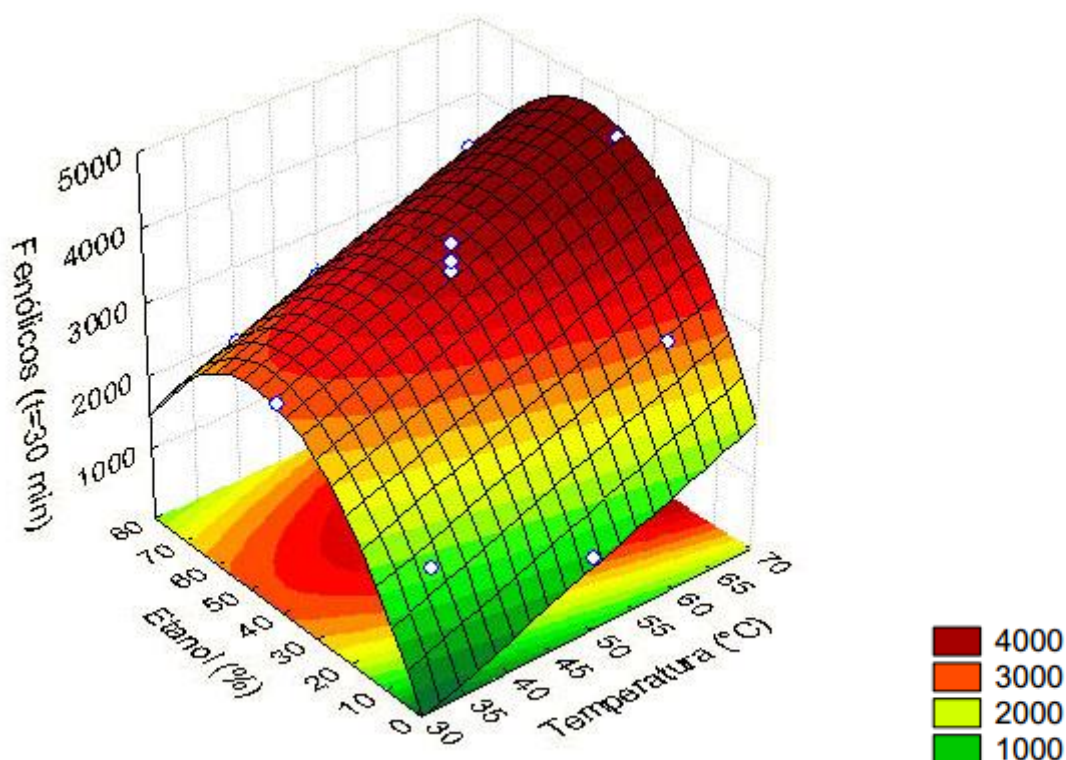


Figura 4.5: Superfície de resposta para a concentração de fenólicos totais em função da concentração de etanol e da temperatura.

O modelo final é dado pela equação:

$$C = 3721,93 + 673,05 T + 527,73 Et - 1048,52 Et^2 \quad (4.2)$$

onde C é a concentração de compostos fenólicos totais no extrato, T e Et são as variáveis independentes codificadas temperatura e concentração de etanol, respectivamente.

É possível observar que o aumento de temperatura levou a um aumento da concentração de compostos fenólicos. Esse comportamento pode ser explicado pela relação entre a difusividade mássica e a temperatura, dada pela equação de Einstein:

$$D \propto \frac{T}{\eta} \quad (4.3)$$

onde D é a difusividade mássica, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade dinâmica. No entanto, o superaquecimento pode levar a uma desnaturação das membranas dos compostos fenólicos que já foram extraídos, logo a temperatura não pode ser aumentada indefinidamente e uma temperatura máxima deve ser determinada para otimizar a extração (CACACE; MAZZA, 2003). Na faixa de temperatura estudada, o comportamento

linear da temperatura mostra que não foi atingida a temperatura de desnaturação das células.

A concentração de etanol influenciou significativamente a extração de compostos fenólicos, e apresentou um comportamento quadrático, mostrando que, a partir de um ponto ótimo, o aumento na concentração de etanol, dificulta a extração dos compostos fenólicos. Variações na concentração de etanol modificam as propriedades físicas do solvente, como densidade, viscosidade dinâmica e constante dielétrica, além de modificar a solubilidade dos compostos. A adição de etanol a água diminui a energia de atração das moléculas de água, facilitando a solubilização dos compostos fenólicos. Porém conforme aumenta a concentração de etanol, a interação em as suas moléculas também aumenta, aumentando novamente a energia a ser quebrada pelos compostos fenólicos, diminuindo a solubilidade (Cacace e Mazza, 2003).

A Equação (4.2) foi derivada em relação a variável Et e igualada a zero, para encontrar o ponto de máximo rendimento. Em termos de variáveis reais o rendimento máximo da extração foi alcançado utilizando a concentração de 47% (v/v) de etanol e a temperatura de 70°C. Utilizando as condições de planejamento otimizadas é possível obter um teor máximo de compostos fenólicos de 4686 mg EAG/100 g de bagaço.

Da Porto, Natolino e Decorti (2015) estudaram, através de um planejamento experimental fatorial 2^k , a influência do tempo de aplicação de ultrassom e da temperatura para a extração de compostos fenólicos do bagaço de uva. A faixa de tempo estudada foi de 4 a 10 minutos e de temperatura de 20 a 80°C. Nos experimentos o tempo de aplicação do ultrassom é o tempo total de extração. O modelo proposto no artigo é dado pela equação:

$$C = 755,16 + 20,9619 X_1 + 0,9264 X_2 - 0,3133 X_1 X_2 \quad (4.4)$$

onde C é a concentração de compostos fenólicos, X_1 é a temperatura e X_2 é o tempo de extração. A máxima concentração de compostos fenólicos foi obtida com a temperatura de 80°C, demonstrando ainda um comportamento linear com a temperatura.

Vatai, Škerget e Knez (2009) estudaram a utilização de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos de diferentes cultivares de uva. Observando a Figura 2.4, é possível perceber que o maior rendimento para a extração dos compostos fenólicos foi obtido utilizando acetona 50 % (v/v), seguido pela utilização de etanol 50% (v/v).

Finalmente, compararam-se os resultados obtidos pelo modelo, nas condições ótimas, com os resultados obtidos quando nenhum pré-tratamento foi aplicado e quando a moagem foi aplicada como pré-tratamento. Todos os resultados comparados são referentes aos pontos coletados ao final dos 30 minutos de difusão. A Figura 4.7 apresenta um gráfico de barras para a comparação destes valores.

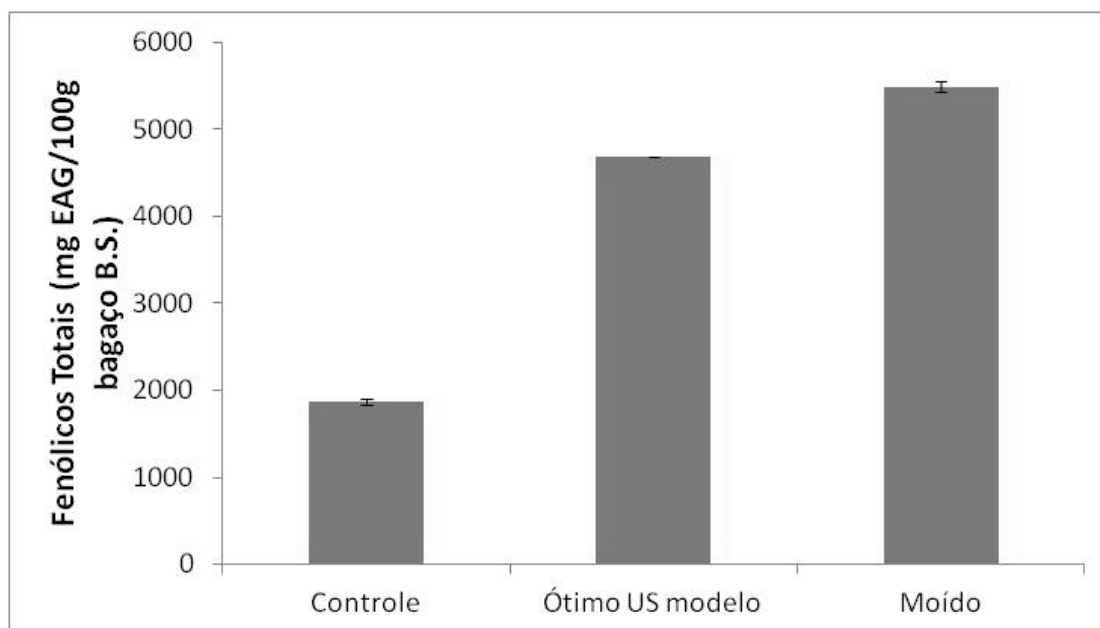


Figura 4.6: Comparação entre as tecnologias de pré-tratamento.

É possível observar que a utilização do ultrassom realmente auxilia na extração dos compostos de fenólicos, apresentando um aumento de 2,5 vezes na concentração dos compostos de interesse quando comparado ao experimento controle. A moagem como pré-tratamento, por sua vez, apresentou 1,17 vezes mais compostos fenólicos que o obtido pelo modelo otimizado. Para avaliar a significância dos resultados foi realizada uma análise de variância (ANOVA), que é mostrada na Tabela 4.6. Observa-se que houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos e que o moído foi o que apresentou maior concentração de fenólicos totais. Vale ressaltar que uma análise energética deve ser realizada para que se possa, de fato, escolher o melhor tratamento.

Tabela 4.6: Concentração de fenólicos totais para diferentes pré-tratamentos.

Concentração de fenólicos totais (mg EAG/100 g de bagaço)	
Controle	1865 ± 33 ^c
Modelo otimizado	4686 ± 0 ^b
Moído	5492 ± 57 ^a

^{a, b, c} Índices diferentes mostram que houve uma diferença significativa nos resultados quando realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho teve como objetivo otimizar a extração de compostos fenólicos do bagaço de uva utilizando a tecnologia de ultrassom como pré-tratamento à extração. Dessa forma, para as variáveis estudadas no presente trabalho, as condições otimizadas de processo são: 15 minutos de aplicação de ultrassom como pré-tratamento, 3 cm de imersão de sonda, 47 % (v/v) de etanol na solução extratora, e temperatura de 70°C durante a etapa de difusão. Nessas condições, obteve-se uma extração de compostos fenólicos de 4686 mg EAG/ 100g de bagaço.

Comparando os resultados obtidos pelo modelo otimizado com o experimento controle nas mesmas condições, é possível observar um aumento de 2,5 vezes na concentração de compostos fenólicos no extrato. A aplicação da moagem como pré-tratamento aumentou 1,17 vezes a concentração dos compostos fenólicos em relação ao modelo otimizado.

Com os resultados obtidos é possível concluir que o efeito do ultrassom é significativo no aumento do rendimento da extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva, sendo uma tecnologia viável para a extração desses compostos de interesse do bagaço de uva.

Para trabalhos futuros deve-se realizar uma avaliação econômica e energética da utilização do ultrassom quando comparado com a moagem como forma de pré-tratamento. É interessante ainda estudar a recuperação e purificação do bagaço utilizado na extração. Esse estudo deve envolver a análise da remoção do solvente utilizado e também a secagem do bagaço submetido ao ultrassom como pré-tratamento. Devido a sua influência no aumento da transferência de massa, o ultrassom pode ser um pré-tratamento adequado à secagem.

Outro importante estudo que pode ser realizado futuramente está relacionado à forma de separar os compostos fenólicos do solvente utilizado na extração, e também como aumentar a estabilidade desses compostos retirados da uva para, então, serem aplicados como aditivos naturais em alimentos.

6 Referências

- AL-AWWADI, N. A., ARAIZ, C., BORNET, A., DELBOSC, S., et al. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53, 151-157, 2005.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 379–389, 2003.
- CAMARGO, U. A. Árvore do conhecimento. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html>. Acesso em 7/08/2015.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.
- DA PORTO, C.; NATOLINO, A.; DECORTI, D. The combined extraction of polyphenols from grape marc: Ultrasound assisted extraction followed by supercritical CO₂ extraction of ultrasound-raffinate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 98–104, 2015.
- DA PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1076–1080, 2013.
- FAMUYIWA, O., OUGH, C. S. – Grape pomace: possibilities as animal feed. **American Journal of Enology and Viticulture**. 39(2): 44-46, 1982.
- Federação da agricultura do estado do Paraná. Disponível em: <<http://www.faep.com.br/comissoes/frutas/cartilhas/frutas/uvarustica.htm>>. Acesso em 15/08/2015.
- FELLOWS, P. J. Tecnologia do processamento de alimentos: Woodhead Publishing Ltd. 2006. p 153.
- FENNEMA, O. R., DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. Fennema's Food Chemistry. Taylor & Francis Group, ed 4, pg 600-602, 2008.
- GOBO, A. C. B. **Análise da eficiência da extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom**, 2014.
- GONZÁLEZ-CENTENO, M. R. et al. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - A response surface approach. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 6, p. 2176–2184, 2014.
- LEIFERT, W. R.; ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 28, n. 11, p. 729–737, 2008.
- LIU, D. et al. Comparative study of ultrasound-assisted and conventional stirred dead-end microfiltration of grape pomace extracts. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 2, p. 708–714, 2013.
- MASON, T. J. et al. Ultrasound. p. 0–12, 2005.

MELO, P. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. p. 1–101, 2010.

MO, R. Tratamento de gordura localizada e lipodistrofia ginóide com terapia combinada : radiofrequência multipolar , LED vermelho , endermologia pneumática e ultrassom cavitacional Treatment of localized fat and gynoid lipodystrophy with. v. 4, n. 3, p. 241–246, 2012.

MOTA, R. V. DA et al. Composição físico-química de uvas para vinho fino em ciclos de verão e inverno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1127–1137, 2010.

ORRIOLS, I. Tecnologia de la destilacion en los aguardientes de orejo. **I Congresso Internacional de la Viticultura Atlântica**. Isla de la Toja, Espanha, p 291-305, 1994.

RICE, A. C. Solid waste generation and by-product recovery potential from winery residues. **Am. J. Enol. Viticult**, 27 (1): 21-26, 1976.

RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Campinas: Casa do Pão Editora, p. 142, 2005.

SASTRE, J. A. L., SINOVA, P. L. C., PAUNERO, A. A. Los residuos de la industria del vino. **In la utilización de los residuos de la industria vitivinícola em Castilla y León**. Salamanca, Espanha, p 15-20, 1954.

SILVA, J. M. R. Composição da uva, do mosto e do vinho. **100º Curso Intensivo de Vinificação**. Portugal, 2006.

VATAI, T.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 2, p. 246–254, 2009.

TERRA, X, VALLS, J., VITRAC, X., MÉRRILLON, J. M., ARDÈVOL, L., AROLA, A., BLADÉ, C., FERNANDEZ-LARREA, J., PUJADAS, G., SALVADÓ, J., & BLAY, M. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55, 4357-4365, 2007.

WATERHOUSE L. Determination of total phenolics. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, editors. Current protocols in food analytical chemistry. New York, N.Y.: JohnWiley and Sons, Inc. p 46–470, 2001.

YAMAKOSHI, J., SAITO, M., KATAOKA, S., & TOKUTAKE, S. Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 4983-4988, 2002